

PUB-NO: FR002564320A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: FR 2564320 A1

TITLE: Method for producing rabies vaccine on
cultures of non-tumorigenic rabbit cell lines, rabies
vaccine obtained by this method and new cell lines
which can be used for the production of this vaccine

PUBN-DATE: November 22, 1985

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HORAUD, FLORIAN	N/A
SUREAU, PIERRE	N/A
PERRIN, PIERRE	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
PASTEUR INSTITUT	FR

APPL-NO: FR08407746

APPL-DATE: May 18, 1984

PRIORITY-DATA: FR08407746A (May 18, 1984)

INT-CL (IPC): A61K039/205, C12N005/02

EUR-CL (EPC): A61K039/205 ; C12N007/08

ABSTRACT:

CHG DATE=19990617 STATUS=O> The invention relates to a method for producing rabies vaccine. The rabies vaccine of the invention is produced by culturing a fixed strain of rabies virus on a culture of a line of diploid embryonic rabbit skin fibroblast cells (referred to as REF cells). The invention also relates

to a cell line capable of acting as a substrate in the production of the rabies vaccine, and to a method for obtaining it. Use in rabies vaccination.

⑬ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 564 320**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **84 07746**

⑬ Int Cl⁺ : A 61 K 39/205; C 12 N 5/02 / C 12 R 1/91.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

⑭ Date de dépôt : 18 mai 1984.

⑮ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : *Fondation reconnue d'utilité publique :
INSTITUT PASTEUR. — FR.*

⑱ Inventeur(s) : Florian Horaud, Pierre Sureau et Pierre Perrin.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 47 du 22 novembre 1985.

⑳ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

㉑ Titulaire(s) :

㉒ Mandataire(s) : Cabinet Orès.

㉓ Procédé de production de vaccin antirabique sur des cultures de lignées de cellules non tumorigènes de lapin, vaccin antirabique obtenu par ce procédé et nouvelles lignées cellulaires utilisables pour la production dudit vaccin.

㉔ La présente invention est relative à un procédé de pro-
duction de vaccin antirabique.

Le vaccin antirabique conforme à la présente invention se caractérise en ce qu'il est produit par culture d'une souche fixe de virus rabique sur une culture d'une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin (dites cellules FEL).

La présente invention est également relative à une lignée cellulaire apte à servir de substrat dans la production du vaccin antirabique et à son procédé d'obtention.

Application à la vaccination antirabique.

FR 2 564 320 - A1

- 1 -

La présente invention est relative à un nouveau procédé de production de vaccin antirabique sur des cultures de lignées de cellules non tumorigènes de lapin, aux nouvelles lignées cellulaires utilisées pour la production dudit
5 vaccin et au vaccin antirabique obtenu par le procédé susdit.

La rage reste, à l'heure actuelle, une zoonose d'importance mondiale.

La lutte contre le réservoir naturel de la maladie, que constituent les animaux sauvages, est difficile et d'une
10 efficacité douteuse à long terme. Par contre, la vaccination préventive des animaux domestiques est possible, efficace, et d'un intérêt indiscutable tant au plan économique qu'au plan de la protection de l'homme.

En particulier, la vaccination des chiens doit per-
15 mettre d'aboutir à un parfait contrôle sinon à une élimination complète de la rage canine et, par voie de conséquence, à la disparition de la grande majorité des cas de contamination humaine. En attendant d'aboutir à ce résultat, objectif d'une campagne mondiale de l'O.M.S., de nombreux traitements
20 antirabiques humains (vaccination après morsure) doivent être mis en oeuvre.

De grandes quantités de vaccin sont donc nécessaires, tant pour l'usage vétérinaire, que pour l'usage humain.

La seule technologie acceptable pour le présent ou
25 pour un futur proche et lointain (selon les pays et leur état de développement scientifique et technologique) est la production de vaccins sur cultures cellulaires.

De nombreux types de cultures cellulaires sont actuellement proposés et utilisés pour la préparation de vac-
30 cins antirabiques. En particulier, il a été proposé de faire croître des souches de virus rabiques sur des cellules de première explantation obtenues à partir de

1. Cellules primaires de mammifères, et notamment de hamsters, de rein d'embryons de bovin, de rein de singe ;
- 35 2. Cellules primaires d'origine aviaire et notamment d'oeufs

- 2 -

- embryonnés de poulet ou de caille ;
3. Cellules diploïdes humaines en lignées ;
 4. Cellules diploïdes simiennes (provenant de singes Rhésus) ;
 5. Cellules diploïdes de lapin (FEL) ;
 - 5 6. Cellules hétéroploïdes (BHK ou VERO).

Toutefois, les différents systèmes de cultures cellulaires proposés ne répondent pas, en règle générale, simultanément à la totalité des principaux critères de choix d'une culture cellulaire appropriée, c'est-à-dire, notamment, aux
10 critères de facilité de la culture, d'adaptabilité à la production en masse, de productivité en virus (antigène), d'innocuité (absence de pouvoir oncogène), de prix de revient relativement bas, etc...

La présente invention a pour but de pourvoir à un
15 procédé de production de vaccin antirabique qui satisfait simultanément de façon positive à tous les critères de choix d'une culture cellulaire appropriée, en ce qu'il utilise une culture de cellules embryonnaires d'un mammifère très répandu, en particulier dans les principaux pays industrialisés,
20 en ce que les cultures cellulaires utilisées comme substrats de production de vaccin antirabique conformément à l'invention, sont très stables puisqu'elles se répliquent apparemment facilement et de façon illimitée dans le temps, avec une croissance régulière et uniforme, sans subir de transformation morphologique, en ce que leur innocuité est totale et en
25 ce que la facilité de culture de ces lignées cellulaires et leur adéquation à la production en masse ne nuisent en rien à leur immunogénicité.

La présente invention a pour objet un vaccin antirabique à usage humain ou vétérinaire caractérisé en ce qu'il
30 est produit par culture d'une souche fixe de virus rabique sur une culture d'une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin (dites cellules FEL).

Selon un mode de réalisation préféré du vaccin
35 antirabique conforme à la présente invention, ledit vaccin

- 3 -

est un vaccin inactivé, dont l'inactivation est réalisée, de préférence, à l'aide de β -propiolactone.

Conformément à la présente invention, ledit vaccin antirabique résulte de la culture d'une souche fixe de virus rabique sur une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, obtenue par trypsination d'un embryon de lapin, puis culture des fibroblastes recueillis, en milieu Dulbecco approprié et au moins onze passages de la culture primaire dans le même milieu.

Selon un autre mode de réalisation préféré du vaccin antirabique conforme à la présente invention, la souche fixe de virus rabique mise en oeuvre pour être cultivée sur lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, en vue de l'obtention dudit vaccin antirabique, est prise dans le groupe qui comprend la souche de virus fixe PV, qui est la souche de virus rabique isolée par PASTEUR, et des souches dérivées de cette dernière, telles que la souche PV-BHK, la souche PV/RV/2P VERO, la souche PV/RV/2P VERO/2P FEL, en particulier.

Les souches PV-BHK, PV/RV/2P VERO et PV/RV/2P VERO/2P FEL sont des souches dérivées de la souche fixe PV, adaptées à différents substrats cellulaires : la souche PV-BHK est adaptée à la cellule BHK-21 ; la souche PV/RV/2P VERO est la souche PV adaptée à la cellule de rein d'embryon de bovin et ayant subi deux passages successifs sur la cellule VERO et la souche PV/RV/2P VERO/2P FEL résulte de l'adaptation de la souche précédente à la cellule FEL, en lui faisant subir deux passages supplémentaires sur cellule FEL.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré du vaccin antirabique conforme à la présente invention, celui-ci résulte de la culture d'une souche fixe de virus rabique sur une lignée de cellules FEL qui présente les caractéristiques de non-tumorigénicité, de stabilité dans le temps en ce que les cellules de ladite lignée ne présentent aucun signe de transformation morphologique et se répliquent faci-

- 4 -

lement, avec une croissance régulière et uniforme, même après plus de 100 passages successifs.

La présente invention a en outre pour objet une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de
5 peau de lapin, dites cellules FEL.

Selon une caractéristique avantageuse de la lignée de cellules FEL, ladite lignée est une lignée établie à partir de fibroblastes de peau de lapin embryonnaire mis en culture en milieu DULBECCO additionné d'environ 10 % de sérum de
10 veau, la culture primaire étant soumise à une pluralité de passages dans le même milieu additionné d'environ 5 à 10 % de sérum de veau nouveau-né, pour l'établissement d'une population cellulaire présentant une croissance rapide et régulière, qui est recueillie, et éventuellement congelée, pour
15 constituer la semence primaire.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, la semence primaire est recueillie après onze passages.

Selon une autre caractéristique avantageuse de la lignée de cellules FEL conforme à la présente invention, la
20 dite lignée se distingue par : - sa non-tumorigénicité au bout de 21 jours, après inoculation à des souris athymiques de 10^6 cellules FEL/souris, recueillies après 11 à 50 passages ; - sa stabilité, représentée par l'aptitude des cellules à se répliquer sans aucun signe de transformation morphologique
25 que et suivant une croissance régulière et uniforme, même après 100 passages successifs.

La lignée de cellules FEL conforme à la présente invention a été déposée le 16 Mai 1984 sous le n° I-304 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-
30 organismes tenue par l'Institut Pasteur.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse de la lignée de cellules FEL conforme à la présente invention, ladite lignée est apte à être mise en oeuvre comme substrat dans la production de vaccin antirabique, pour per-
35 mettre l'obtention de virus rabique utilisable, après inacti-

- 5 -

5 vation, comme vaccin antirabique présentant un titre infectieux élevé sans nécessiter de concentration, dépourvu de virus latents contaminants, présentant un pouvoir infectieux (avant inactivation) de 5.10^6 à 5.10^7 PFU/ml (PFU = unités de virus formant plages) et une immunogénicité - ou pouvoir protecteur - comparable à celle d'un vaccin antirabique obtenu par culture sur cellules hétéroploïdes telles que cellules VERO, par exemple, sans les inconvénients résultant de l'utilisation de ces dernières cultures.

10 La présente invention a également pour objet un procédé de production de vaccin antirabique mettant en oeuvre la lignée de cellules diploïdes FEL conforme à l'invention, par culture d'une souche fixe de virus rabique sur ladite lignée, caractérisé en ce que l'on infecte une lignée de cellules
15 les diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin (FEL) entretenues en milieu approprié, par une souche de virus rabique, en ce qu'on laisse incuber pendant une heure \pm 15 minutes environ, à $+ 37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, en ce qu'on élimine le milieu en présence duquel l'infection a été réalisée et on le
20 remplace par du milieu frais additionné de sérum de veau nouveau-né, dans lequel la culture est maintenue pendant 18 à 30 heures à $34^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, en ce qu'on remplace ensuite ce milieu par du milieu contenant de l'albumine bovine, dans lequel la culture est maintenue à $34^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, en ce qu'on récolte les surnageants cellulaires à intervalles de temps appropriés et en ce qu'on inactive la suspension de virus rabique ainsi récoltée.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé, le milieu d'entretien des lignées cellulaires, dans
30 lequel est introduite la souche de virus rabique à cultiver, est du milieu DULBECCO complet additionné d'environ 5 à 10 % de sérum de veau nouveau-né.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de production de vaccin antirabique conforme à l'invention, la
35 souche fixe de virus rabique est introduite à raison de 0,1 à

- 6 -

0,3 DL₅₀/cellule.

On entend par DL₅₀ la dose léthale intracérébrale 50 % contrôlée chez la souris.

5 Selon encore un autre mode de mise en oeuvre du procédé de production de vaccin antirabique conforme à l'invention, le milieu de remplacement du milieu d'infection, pour le maintien de la culture de virus, est du milieu DULBECCO complet additionné d'environ 5 % de sérum de veau nouveau-né.

10 Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de production de vaccin antirabique conforme à l'invention, le milieu de remplacement du milieu de maintien de la culture du virus rabique est un milieu DULBECCO complet contenant éventuellement environ 0,3 % d'albumine bovine.

15 Selon encore un autre mode de mise en oeuvre du procédé de production de vaccin antirabique conforme à l'invention, les surnageants cellulaires contenant le virus rabique sont récoltés tous les 2 à 4 jours environ.

20 Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de production de vaccin antirabique conforme à l'invention, le virus rabique présent dans les surnageants cellulaires récoltés est inactivé par un agent d'inactivation approprié tel que, notamment, la β -propiolactone à la dilution finale d'environ 1/7000 à 1/10000 et de préférence d'environ 1/8000.

25 La présente invention a en outre pour objet un procédé de production d'une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, qui est caractérisé en ce que l'on soumet un embryon de lapin d'au moins 15 jours et d'au plus 20 jours, à un traitement de trypsination
30 pour recueillir des fibroblastes de peau de lapin, qui sont mis en culture en milieu DULBECCO complet additionné d'environ 10 % de sérum de veau nouveau-né, la culture primaire initiale étant soumise à une pluralité de passages, de préférence 10 à 12 passages, en milieu DULBECCO complet additionné
35 d'environ 5 à 10 % de sérum de nouveau-né.

- 7 -

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé, la lignée cellulaire ainsi établie est congelée pour être stockée en vue de son utilisation ultérieure.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de ce
5 procédé, la lignée cellulaire ainsi établie est maintenue en milieu DULBECCO additionné d'environ 5-10 % de sérum de veau nouveau-né, jusqu'à l'inoculation de virus rabique.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la
10 description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que cet exem-
15 ple de mise en oeuvre est donné uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont il ne constitue en aucune manière une limitation.

EXEMPLE DE PREPARATION DE VACCIN ANTIRABIQUE

A. ETABLISSEMENT DES CELLULES FEL

20 Les cellules FEL (fibroblastes embryonnaires de lapin) ont été établies en mettant des fibroblastes de peau de lapin obtenus par trypsination d'un embryon de lapin (Fauve de Bourgogne) de 17 jours, en culture dans du milieu DULBECCO complet additionné de 10 % de sérum de veau, puis en soumet-
25 tant la culture primaire obtenue à 11 passages successifs en milieu DULBECCO complet additionné de 10 % de sérum de veau nouveau-né.

Dans la pratique, la lignée établie au bout de 11 passages successifs est congelée pour servir de semence pri-
30 maire ; elle est décongelée en milieu DULBECCO complet additionné de 5-10 % de sérum de veau nouveau-né, chaque fois qu'il est désiré de l'employer comme substrat dans la production de vaccin antirabique.

B. PREPARATION DU VACCIN

35 La lignée de cellules FEL obtenue, établie en mi-

lieu DULBECCO complet additionné de 5-10 % de sérum de veau nouveau-né, est infectée par une souche de virus rabique à raison de 0,1 à 0,3 DL₅₀/cellule (doses léthales 50 % contrôlées chez la souris).

5 Après une heure d'incubation à + 37°C, le milieu d'infection est éliminé et remplacé par du milieu DULBECCO complet additionné de 5 % de sérum de veau nouveau-né, dans lequel la culture du virus est poursuivie pendant 24 heures à une température de 34°C.

10 Au bout de ce temps, le milieu à 5 % de sérum est éliminé et remplacé par un milieu DULBECCO complet contenant éventuellement 0,3 % d'albumine bovine, dans lequel la culture du virus rabique se poursuit à 34°C.

15 Les surnageants cellulaires contenant le virus rabique en suspension sont récoltés tous les trois jours environ.

Le virus ainsi récolté est inactivé par la β -propiolactone (Kp₁₀ : 47-51°C ; d = 1,14) à la dilution finale de 1/8000.

20 C. REPLICATION DU VIRUS RABIQUE SUR CELLULES FEL

La sensibilité des cellules FEL et leur aptitude à produire du virus et des antigènes rabiques ont été testées dans les trois conditions suivantes d'immobilisation des cellules FEL :

- 25 1. Dans des flacons stationnaires en verre et en plastique.
2. Dans des flacons roulants en verre et en plastique.
3. Dans un appareil de type semi-industriel "Gyrogen" (Société Chemap) constitué d'une cuve en verre et
- 30 de tubes en verre animés d'une rotation uniforme sur lesquels les cellules sont immobilisées.

a) Production de particules infectieuses.

Les cellules FEL se sont révélées sensibles à plusieurs souches fixes de virus rabiques adaptées à différents

35 substrats cellulaires. Ces souches dérivent de celle isolée

- 9 -

par PASTEUR (souche PV déposée à l'ATCC sous le n° VR 320) et sont :

1. La souche PV adaptée à la cellule BHK-21 (C13) : dénommée "PV-BHK".
- 5 2. La souche PV adaptée à la cellule de rein d'embryon de bovin dénommée "PV/RV" (utilisée pour la production du vaccin de l'Institut Pasteur Production). Elle a subi deux passages successifs sur la cellule VERO (PV/RV/2P VERO).
- 10 3. La même souche que celle utilisée en 2. ci-dessus, mais avec deux passages supplémentaires sur la cellule FEL (PV/RV/2P VERO/2P FEL).

Le maximum de particules infectieuses libérées dans le milieu de culture (5.10^6 à 5.10^7 PFU/ml, unités de virus formant plages) est obtenu entre le sixième et le dixième jours suivant l'infection.

b) Production d'antigènes rabiques.

De nombreuses études ont montré que l'immunogénicité d'une suspension de virus rabique inactivé est plutôt liée à la quantité de glycoprotéines (protéines constitutives des spicules) qu'au pouvoir infectieux de la préparation avant inactivation.

L'étude cinétique de la production de glycoprotéines et l'examen de l'état physique des particules virales ont été effectués à l'aide d'une méthode immunoenzymatique. Il en résulte que le maximum de glycoprotéines est libéré à des temps variables après l'infection, selon la souche : entre le 4^e et 7^e jours pour PV/BHK et entre le 14^e - 19^e jours pour PV/RV/2P VERO et PV/RV/2P VERO/2P FEL. Pendant la période de haute production de glycoprotéines, des récoltes tous les deux ou trois jours peuvent être effectuées.

Le niveau de production de glycoprotéines avec les lignées de cellules FEL est sensiblement identique à celui obtenu avec la cellule VERO, quelle que soit la souche rabique utilisée.

- 10 -

Dans ces conditions et en parallèle avec la cellule VERO, les résultats suivants ont été obtenus avec la cellule FEL :

5	SOUCHE	Immunogénicité : Pouvoir Protecteur (Unités Internationales x)	
		CELLULES FEL	CELLULES VERO
	PV/RV/2P VERO	0,87	0,53
	PV/RV/2P VERO/2P FEL	2,6 à 5,0	7,7 à 8,5
	PV/BHK	3,6 ^{xx}	

10 x Vaccin de référence (concentré et purifié) : 12 Unités internationales

xx Production effectuée avec l'appareil "Gyrogen" : Récolte au 7^e jour.

15 Etant donné la variabilité du test d'évaluation de l'immunogénicité d'un vaccin rabique, on peut en conclure que les cellules FEL permettent la production d'un vaccin rabique d'immunogénicité comparable à celui obtenu avec les cellules VERO.

20 D. Le vaccin ainsi obtenu peut être commodément lyophilisé en présence d'un stabilisateur approprié connu en lui-même.

Il est mis en ampoules scellées contenant la poudre lyophilisée qui est mise sous forme injectable extemporanément par dissolution dans un véhicule convenable.

E. CARACTERISATION DES CELLULES FEL

25 Pour être employée comme substrat dans la production des vaccins viraux inactivés, une lignée cellulaire doit remplir les exigences requises par l'O.M.S. (O.M.S. - Rapport Technique 673. Révision 1981, p. 76-82).

30 Les études de caractérisation effectuées par les Inventeurs ont démontré que les cellules FEL conviennent à la production de vaccins pour les raisons suivantes :

1°) Tumorigénèse. Elle a été étudiée au niveau des 11^{ème} et 50^{ème} passages sur des souris nu/nu, en parallèle avec des cellules HeLa (témoin positif). Les résultats montrent que l'inoculation de 10⁶ cellules FEL par souris n'in-

- 11 -

duit pas de tumeurs ni de métastases (examens macro- et microscopiques) chez les souris athymiques après trois semaines d'observation. Dans les mêmes conditions d'inoculation, les cellules HeLa ont induit des tumeurs chez 100 pour 100 des animaux. Les tumeurs induites atteignent une grosseur de 1/1 cm après trois semaines.

2°) Stabilité des cellules FEL au cours des passages. Pour déterminer la durée de vie des cellules FEL (lignée cellulaire à durée de vie limitée ou lignée à durée de vie illimitée : lignée stable), les Inventeurs ont effectué des passages successifs et ont montré que pendant 100 passages les cellules se répliquent facilement. Au cours de ces passages, aucun signe de transformation morphologique n'a été observé. La croissance est toujours régulière et uniforme.

15 3°) Sensibilité des cellules FEL à l'interféron. Les Inventeurs ont également démontré que seul l'interféron de lapin agit sur les virus cultivés dans les cellules FEL. Ce test montre l'identité d'espèce de cette cellule.

20 Le vaccin antirabique obtenu conformément à la présente invention présente l'avantage de pouvoir être produit en grandes quantités, à partir d'une matière première peu coûteuse et aisément disponible. La productivité en virus est au moins égale à ce que permettent d'obtenir les procédés proposés antérieurement, tout en assurant l'obtention d'un vaccin présentant une innocuité totale, du fait de l'origine et des caractéristiques de la lignée FEL.

25 La cellule BHK-21 a été déposée sous le n° CCL 10 à l'ATCC.

- 12 -

REVENDEICATIONS

1°) Vaccin antirabique apte à assurer l'immunité contre la rage des hommes et des animaux, caractérisé en ce qu'il est produit par culture d'une souche fixe de virus rabique sur une culture d'une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin (dites cellules FEL).

2°) Vaccin antirabique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vaccin inactivé, dont l'inactivation est réalisée, de préférence, à l'aide de B-propionolactone.

3°) Vaccin antirabique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il résulte de la culture d'une souche fixe de virus rabique sur une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, obtenue par trypsination d'un embryon de lapin, puis culture des fibroblastes recueillis, en milieu Dulbecco approprié et au moins onze passages de la culture primaire dans le même milieu.

4°) Vaccin antirabique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche fixe de virus rabique mise en oeuvre pour être cultivée sur lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, en vue de l'obtention dudit vaccin antirabique, est prise dans le groupe qui comprend la souche de virus fixe PV, qui est la souche de virus rabique isolée par PASTEUR, et des souches dérivées de cette dernière, telles que la souche PV-BHK, la souche PV/RV/2P VERO, la souche PV/RV/2P VERO/2P FEL, en particulier.

5°) Vaccin antirabique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il résulte de la culture d'une souche fixe de virus rabique sur une lignée de cellules FEL qui présente les caractéristiques de non-tumorigénicité, de stabilité dans le temps en ce que les cellules de ladite lignée ne présentent aucun signe de transformation morphologique et se répliquent facilement, avec une croissan-

- 13 -

ce régulière et uniforme, même après plus de 100 passages successifs.

6°) Lignée cellulaire apte à servir de substrat dans la production du vaccin antirabique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin, dites cellules FEL.

7°) Lignée cellulaire selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite lignée est une lignée établie à partir de fibroblastes de peau de lapin embryonnaire mis en culture en milieu DULBECCO additionné d'environ 10 % de sérum de veau, la culture primaire étant soumise à une pluralité de passages dans le même milieu, additionné d'environ 5 à 10 % de sérum de veau nouveau-né, pour l'établissement d'une population cellulaire présentant une croissance rapide et régulière, qui est recueillie, et éventuellement congelée, pour constituer la semence primaire.

8°) Lignée cellulaire selon la revendication 7, caractérisée en ce que la semence primaire est recueillie après onze passages.

9°) Lignée de cellules FEL selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle se distingue par : - sa non-tumorigénicité au bout de 21 jours, après inoculation à des souris athymiques de 10^6 cellules FEL/souris, recueillies après 11 à 50 passages ; - sa stabilité, représentée par l'aptitude des cellules à se répliquer sans aucun signe de transformation morphologique et suivant une croissance régulière et uniforme, même après 100 passages successifs.

10°) Lignée de cellules FEL selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle a été déposée le 16 Mai 1984 sous le n° I-304 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

11°) Procédé de production du vaccin antirabique

- 14 -

selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, par culture d'une souche fixe de virus rabique sur une lignée de cellules diploïdes FEL selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que l'on infecte une lignée de cellules
5 diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin (FEL) selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, entretenues en milieu approprié, par une souche de virus rabique, en ce qu'on laisse incuber pendant une heure \pm 15 minutes environ, à $+ 37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en ce qu'on élimine le milieu en
10 présence duquel l'infection a été réalisée et on le remplace par du milieu frais additionné de sérum de veau nouveau-né, dans lequel la culture est maintenue pendant 18 à 30 heures à $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en ce qu'on remplace ensuite ce milieu par du milieu contenant de l'albumine bovine, dans lequel la culture
15 est maintenue à $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en ce qu'on récolte les surnageants cellulaires à intervalles de temps appropriés et en ce qu'on inactive la suspension de virus rabique ainsi récoltée.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le milieu d'entretien des lignées cellulaires, dans
20 lequel est introduite la souche de virus rabique à cultiver, est du milieu DULBECCO complet additionné d'environ 5 à 10 % de sérum de veau nouveau-né.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que la souche fixe de virus
25 rabique est introduite à raison de 0,1 à 0,3 DL_{50} /cellule.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que le milieu de remplacement du milieu d'infection, pour le maintien de la culture de virus, est du milieu DULBECCO complet additionné d'environ
30 5 % de sérum de veau nouveau-né.

15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que le milieu de remplacement du milieu de maintien de la culture du virus rabique est un milieu DULBECCO complet.

35 16°) Procédé selon l'une quelconque des revendica-

- 15 -

tions 11 à 15, caractérisé en ce que les surnageants cellulaires contenant le virus rabique sont récoltés tous les 2 à 4 jours environ.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que le virus rabique présent dans les surnageants cellulaires récoltés est inactivé par un agent d'inactivation approprié tel que, notamment, la β -propiolactone à la dilution finale d'environ 1/7000 à 1/10000 et de préférence d'environ 1/8000.

18°) Procédé de production d'une lignée de cellules diploïdes de fibroblastes embryonnaires de peau de lapin selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que l'on soumet un embryon de lapin d'au moins 15 jours et d'au plus 20 jours, à un traitement de trypsination pour recueillir des fibroblastes de peau de lapin, qui sont mis en culture en milieu DULBECCO complet additionné d'environ 10 % de sérum de veau, la culture primaire initiale étant soumise à une pluralité de passages, de préférence 10 à 12 passages, en milieu DULBECCO complet additionné d'environ 5 à 10 % de sérum de veau nouveau-né.

19°) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la lignée cellulaire ainsi établie est congelée pour être stockée en vue de son utilisation ultérieure.

20°) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la lignée cellulaire ainsi établie est maintenue en milieu DULBECCO additionné d'environ 5-10 % de sérum de veau nouveau-né jusqu'à l'inoculation de virus rabique.